

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-151075

(43)Date of publication of application : 08.06.1999

(51)Int.Cl.

A23L 1/30
A23C 9/152
// A61K 31/00
A61K 31/20
C12P 7/64
(C12P 7/64
C12R 1:645)

(21)Application number : 10-240168

(71)Applicant : MARTEK BIOSCIENCES
CORP

(22)Date of filing :

26.08.1998

(72)Inventor : KYLE DAVID J

(30)Priority

Priority number : 91 645454

Priority date : 24.01.1991

Priority country : US

(54) FUNGAL OIL CONTAINING ARACHIDONIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a human nutritive composition containing arachidonic acid important for the metabolisms of the human bodies by compounding a non- modified fungal oil containing a specific amount of triglyceride type arachidonic acid and a smaller amount of eicosapentaenoic acid.

SOLUTION: This human nutritive composition contains a modified fungal oil containing at least about 10% of a triglyceride type arachidonic acid(ARA) and eicosapentaenoic acid(EPA) in an amount not exceeding 1/5 of the amount of ARA. The fungal oil is produced from a fungus belonging to the genus *Mortierella*, such as *Mortierella alpina* (ATCC \leq 42430). The ARA is important for the metabolisms of human bodies, but can not be synthesized in the human bodies. The fungal oil is added to a modified milk in an amount sufficient for supplying an ARA content corresponding to that of human milk.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-151075

(43) 公開日 平成11年(1999) 6月8日

| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | F I |
|-----------------------------------|-------------|-----------------------|
| A 2 3 L 1/30 | | A 2 3 L 1/30 Z |
| A 2 3 C 9/152 | | A 2 3 C 9/152 |
| // A 6 1 K 31/00 | 6 0 3 | A 6 1 K 31/00 6 0 3 B |
| | 31/20 6 0 2 | 31/20 6 0 2 |
| C 1 2 P 7/64 | | C 1 2 P 7/64 |
| 審査請求 有 請求項の数21 O L (全 7 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願平10-240168
(62) 分割の表示 特願平4-504604の分割
(22) 出願日 平成4年(1992) 1月22日

(31) 優先権主張番号 6 4 5 4 5 4
(32) 優先日 1991年1月24日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 598083706
マーテック・バイオサイエンス・コー
ポレーション
Martek Corporation
アメリカ合衆国、21045 メリーランド州、
コロニア、ドビン・ロード 6480
(72) 発明者 キール、デイビッド・ジェイ
アメリカ合衆国、21228 メリーランド州、
カトズヴィル、ナーベス・ロード 1801
(74) 代理人 弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アラキドン酸を含む真菌油

(57) 【要約】

【課題】 エイコサペンタエン酸 (E P A) の生産を伴うことのない、経済的で商業的に実行可能なアラキドン酸 (A R A) の製造法が必要とされる。本発明の目的はこの必要性を満たすことである。さらに、本発明の目的は、調合乳中の A R A 量がヒトの母乳中の量とほぼ等しくなるように調合乳に使用される添加剤およびその添加剤源を提供することである。本発明の別の目的は腸内、腸管外または皮内生成物において使用される A R A 含有菌油を提供することである。

【解決手段】 少なくとも約10%のトリグリセリド形 A R A および A R A の量の 1 / 5 を超えない量の E P A を含む未修飾の菌油、および該油を含む組成物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも約10%のトリグリセリド形アラキドン酸（ARA）およびARAの量の1/5を超えない量のエイコサペンタエン酸（EPA）を含む未修飾の真菌油（fungal oil）を含む、ヒト栄養組成物。

【請求項2】 真菌油が少なくとも約30%のARAを含む、請求項1記載のヒト栄養組成物。

【請求項3】 真菌油がARAの量の1/10を超えない量のEPAを含む、請求項1または2記載のヒト栄養組成物。

【請求項4】 真菌油が実質的にEPAを含まない、請求項1または2記載のヒト栄養組成物。

【請求項5】 調合乳である、請求項1ないし4のいずれか1項記載のヒト栄養組成物。

【請求項6】 ヒトの母乳中のARA量に匹敵するARAを含む調合乳である、請求項1ないし4のいずれか1項記載のヒト栄養組成物。

【請求項7】 少なくとも約30%のトリグリセリド形ARAおよびARAの量の1/5を超えない量のEPAを含む真菌油を、ヒトの母乳中のARA量に相当するARA含有量を提供するのに十分な量で調合乳に加えることからなる、ARA含有トリグリセリドを請求項5項記載の調合乳に提供する方法。

【請求項8】 油がモルティエラ種により生産された油である、請求項7記載の方法。

【請求項9】 油がモルティエラアルピナにより生産された油である、請求項7記載の方法。

【請求項10】 少なくとも約10%のトリグリセリド形ARAを含む真菌油であって、ヒトに付加的なARAを提供するのに十分な量存在する該真菌油を含む、付加的なARAをヒトに提供するのに適した組成物。

【請求項11】 油が少なくとも約30%のARAを含む、請求項10記載の組成物。

【請求項12】 真菌油がARAの量の1/10を超えない量のEPAを含む、請求項10または11記載の組成物。

【請求項13】 真菌油が実質的にEPAを含まない、請求項10または11記載の組成物。

【請求項14】 経腸投与される、請求項10記載の組成物。

【請求項15】 非経口投与される、請求項10記載の組成物。

【請求項16】 ヒトが妊婦または授乳期の母親である、請求項10記載の組成物。

【請求項17】 局所投与される、請求項10記載の組成物。

【請求項18】 少なくとも約30%のARAを含む、請求項10記載の組成物中にて使用するための真菌トリグリセリド油。

【請求項19】 ARAの量の1/10を超えない量のE

PAを含む、請求項18記載の真菌油。

【請求項20】 菌がモルティエラ種である、請求項18記載の真菌油。

【請求項21】 菌がモルティエラアルピナである、請求項20記載の真菌油。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、アラキドン酸の製造法、アラキドン酸を含有する組成物およびその使用に関する。

【0002】

【従来の技術】アラキドン酸（ARA）はオメガー6群の長鎖多不飽和脂肪酸（PUFA）（5，8，11，14-エイコサテトラエン酸、20：4）である。ARAはヒトの体内に最も豊富に存在するC₂₀PUFAである。それは特に器官、筋肉および血液組織に存在し、主として血液、肝臓、筋肉および他の主要な器官系中のリン脂質と関連づけられる構造脂質として主要な役割を果たしている。その構造脂質としての主要な役割の他に、ARAはまたプロスタグランジンE₂（PGE₂）、プロスタサイクリンI₂（PGI₂）、トロンボキサンA₂（TxA₂）、ロイコトリエンB₄（LTB₄）およびC₄（LTC₄）のような幾つかの循環エイコセノイドの直接プレカーサーである。これらのエイコセノイドはリポタンパク質代謝、血液レオロジー、血管の調子、白血球機能および血小板活性化において調節作用を示す。

【0003】ヒトの代謝において重要であるにも拘わらず、ARAはヒトの体内で新たに合成できない。ARAは必須脂肪酸のリノレン酸（LOA）の延長および不飽和化により合成される。このプロセスはヒトの体内に低レベルで存在する酵素である酵素Δ6-デサチュラーゼの存在を必要とする〔Burreら、Lipids, 25, 354~356（1990年）〕。したがって、日々の食事においてARAを摂取する必要がある、また幼児期のような体が非常に早く成長する時期には特に重要である。

【0004】生まれて1年の間に幼児は体重が2倍または3倍になる。その結果、高レベルの食事によるARAが必要とされる。この増加した需要を満たすべく、ヒトの母乳は高レベルのARAを含有する〔Sandersら、A m. J. Clin. Nutr., 31, 805~813（1978年）〕。ARAは母乳に最も多く存在するC₂₀PUFAである。赤ん坊を母乳で育てる、特に菜食主義の母親の多くは補助的に食事からARAを摂取している。しかしながら、多くの母親は赤ん坊を母乳で育てないで、すなわち幼児の急速な成長の全期間の間母乳を与えないで代わりに調合乳（infant formula）を利用している。

【0005】本発明者らに知られている市販の調合乳でARAを含有するものはない。Clandininらの米国特許第4,670,285号（参考文献として本明細書に組込まれる）にはARAを含む脂肪酸についての幼児の必要量が

開示されている。Clandininらはこれらの脂肪酸を与えるために調合乳の脂肪成分として卵黄、魚油または赤血球リン脂質および植物油のブレンドを提案している。しかしながら、魚油は多量のエイコサペンタエン酸（EPA）を含有する。EPAは幼児の体内でのARA合成を抑制することが知られている【Carlsonら、INFORM, 1, 306（1990年）】。したがって、追加的なEPAを与えることなくARAを与えることが望ましい。さらに、卵黄は比較的低濃度のARAを含有するため、Clandininらの混合物は経済的に実行可能ではない。

【0006】ARAは植物油でなく動物油に存在するため、その商業規模での製造は望ましいが実現にならない目的となっている。Shinmenらは、Microbiol. Biotech., 31, 11~16（1989年）で従来の攪拌されたタンク発酵を利用する単離した菌類、*Mortierella alpina*（モルティエラアルピナ）によるARAの製造を報告している（Shinmenらの日本特許第1,215,245号参照）。培養後、有機体は採取、乾燥され、これらの脂質は真菌バイオマス（fungal biomass）から有機溶媒で抽出され、そして脂質は化学的に（共有結合的に）変性される。例えば、脂質混合物は補助食として使用する前に加水分解またはエチルエステルに変換され、次いでシクロデキストリンと混合される。Shinmenらは非変性微生物油の投与を開示または示唆していない。

【0007】紅藻類の*Prophyridium cruentum*は他の中で大量に生育することができ、40%までのARAを含有する脂質を有する【Ahernら、Biotech. Bioeng. 25, 1057~1070（1983年）】。不運にも、ARAは主に母乳に存在しない複合極性脂質のガラクト脂質と関連づけられる。したがって、生成する使用可能なARAの総量はバイオマスの1%フラクションであり、またARAの形態はさらに変性することなく調合乳への添加剤として使用するのに適していない。

【0008】Suzukiらの米国特許第4,870,011号にはモルティエラ（*Mortierella*）属の菌からT-リノレン酸のような脂質を得るための方法が開示されている。r-リノレン酸は菌の含まれた脂質混合物から精製される。

【0009】MilupaのDE3603000A1には高級多不飽和脂肪酸脂肪混合物および調合乳の脂肪成分としてのその使用が開示されている。脂肪混合物はARAおよびドコサヘキサエン酸（DHA）をそれぞれ2.5:1の比で多量に含有し、またコレステロールも多量に含有する。脂肪酸源の例としてはある種のマクロ藻類、魚油、牛および豚の臓器脂肪または高精製卵黄油が挙げられる。DHAおよびARAの源は褐藻類および紅藻類のマクロ藻類である

と言われている。油源として微生物の何れかを使用することについては示唆されていない。藻および魚の油もまた典型的には、ARAの生体内での合成を抑制するEPAを含有する。さらに、高精製卵黄油は経済的なARA源ではない。その上、従来の調合乳に補足するための、ARAが濃縮された添加剤については開示されていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】したがって、好ましくはEPAの生産を伴うことのない、経済的で商業的に実行可能なARAの製造法が必要とされる。本発明の目的はこの必要性を満たすことである。

【0011】さらに、本発明の目的は、調合乳中のARA量がヒトの母乳中の量とほぼ等しくなるように調合乳に使用される添加剤およびその添加剤源を提供することである。

【0012】本発明の別の目的は腸内、腸管外または皮内生成物において使用されるARA含有真菌油を提供することである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明はアラキドン酸を含有する真菌油（ARASCO）の製造および使用、並びにこのような油を含有する組成物に関する。該油は単細胞油と呼ぶことができる。菌は油生成条件下で培養され、採取され、次いで油が抽出され、回収される。油はさらに変性することなく直接使用してARAを新生児、妊娠しているかまたは乳飲み子の母親、あるいはARA不足による病状を示す人達のようなARAを必要とする人達に補給することができる。本発明の利点にはその製造のしやすさ、高純度および検出できる量のEPAの不存在が含まれている。

【0014】本発明によれば、経済的なアラキドン酸（ARA）源が得られる。1つの態様において、本発明は実質的にエイコサペンタエン酸（EPA）を含まずに、アラキドン酸を含有する真菌油（ARASCO）の製造法に関する。本明細書において、「実質的に含まない」なる用語はEPAが油中のARA量の約1/5以下で存在することを意味する。この油、すなわち単細胞油は非変性の形態で投与することができる。本明細書において、「非変性」なる用語は脂肪酸の化学的性質または油それ自体が共有結合的に変化されていないことを意味する。したがって、例えば油の摂取後に転換できるARASCOまたはARAの一時的な変形は本発明の範囲内である。

【0015】

【表1】

表1. 幾つかの菌種の脂肪酸組成物

| 種 | 脂 肪 酸 | | | | | | | | 総脂肪 |
|----------------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 14:0 | 16:0 | 16:1 | 18:1 | 18:2 | 18:3 | 20:4 | 20:5 | |
| モルティエセラ アルピナ | -- | 8.2 | -- | 33.5 | 16.3 | 23.3 | 13.0 | -- | 3.0 |
| モルティエセラ エロンゲータ | 2.0 | 13.2 | -- | 26.6 | 11.9 | 13.2 | 13.8 | 2.4 | 4.0 |
| モルティエセラ イサベリーナ | 0.3 | 15.7 | 0.8 | 55.8 | 11.1 | 9.0 | -- | -- | 7.3 |
| サブログニア パラジチカ | 7.4 | 19.1 | 1.9 | 6.3 | 24.5 | 12.5 | 10.5 | 10.5 | 9.3 |
| ピチウム カチヌラタム | 6.5 | 9.9 | 10.3 | 21.2 | 18.5 | 3.5 | 13.4 | 10.9 | 5.0 |
| ピチウム コロラタム | 13.6 | 9.9 | -- | 14.7 | 10.9 | 2.5 | 24.3 | 21.7 | 2.2 |
| ピチウム グラシル | 14.7 | 9.1 | 2.2 | 14.8 | 12.6 | 3.6 | 22.1 | 5.7 | 4.5 |
| ピチウム イレギュレア | 10.3 | 15.4 | 6.9 | 12.3 | 21.0 | 3.9 | 10.6 | 12.4 | 11.9 |
| ピチウム ウルチマム | 9.5 | 16.7 | 10.5 | 17.1 | 20.7 | 1.3 | 9.0 | 6.9 | 13.3 |

【0016】以前にその脂肪酸が特性決定された菌種の殆んどはARAを生成しないことがわかっている〔Weete, J. D. のFungal Lipid Biochemistry, Plenum Press, N. N. (1974年)〕。ARAを生成するこれらの種のうち、以前に特性決定されたすべてのピチウム (Pythium) 種を含む多くはARAの他に有意な量のエイコサペンタエン酸 (EPA) を生成する。表1にP. insidiosum (ピチウムインシディオサム) の脂肪酸分布および他の菌種の脂肪酸分布を示す。予想外に、P. insidiosumはEPAの生成を伴うことなくARAを生成することがわかった。魚油の場合と同様に、食事での補給においてEPAのレベルが高いと、食事のリノレン酸 (LOA) からARAを生成する能力が抑制される。したがって、ARAおよびEPAの両方を生成する菌種を本発明の方法において利用することができるが、有意な量のEPAを生成しない種を使用するのが好ましい。このような好ましい種にはピチウムインシディオサムおよびモルティエセラアルピナが含まれる。これらの種は何れも商業的に入手することができ、またRockville, MarylandのAmerican Type Culture Collectiveにそれぞれ受入れ番号28251および42430で保管されている。この開示全体を通して、特に断りがなければピチウムインシディオサムは、代表的な菌種である。

【0017】本発明の態様が克服する重要な問題の1つは、食事の増大したレベルのEPAの存在により生じる幼児の体内でのARA生合成の抑制である。この問題はヒトの母乳に存在するものと実質的に同様のレベルで調合乳に使用されるARAを提供することにより解決される。典型的には、ヒトの母乳中のARA:EPAの比は約20:1である。本発明は特に、食事のEPAの負作用を克服するのに十分な量のARAを与える微生物油を包含する。好ましくは、ARAを含有する油の使用は少なくとも約5:1のARA:EPA比をもたらす。より好ましくはその比は少なくとも約10:1であり、最も好ましくは少なくとも約20:1である。最終生成物中のARA量がEPA量に関してより高いと、より望ましい結果が得られる。

【0018】本発明の方法において、菌はARA含有油

を生成するのに適した培養条件下で培養される。一般に菌培養技術は当業者に良く知られており、またこれらの技術は本発明の方法に適用することができる。例えば、接種量の菌の培養は振とうフラスコ中での液内培養により行うことができる。フラスコに増殖培地を入れ、菌糸体を接種し、そして往復振とう機上で約3~4日間増殖する。

【0019】増殖培地の組成は変えることができるが、通常は炭素および窒素源を含有する。好ましい炭素源はグルコースであり、その量は増殖培地1 lあたり約10~100 gのグルコースである。典型的には、約15 g/lが振とうフラスコ培養に使用される。その量は最終培養物の所望の密度に応じて変えることができる。使用することのできる他の炭素源には糠みつ、高フルクトースコーンシロップ、加水分解されたスターチまたは発酵プロセスで使用される低コストの従来の炭素源が含まれる。さらに、ラクトースをピチウムインシディオサム用の炭素源として与えることができる。したがって、ラクトースを多量に含み、非常に低コストの炭素源である乳清透過物を基質として使用することができる。当業者は容易にこれらの炭素源の適当な量を決定することができる。通常、培養過程の間に追加の炭素を加える必要がある。これは有機体がたくさんの炭素を使用するので、それをすべてバッチ式で加えることは実行できないためである。

【0020】窒素は典型的に酵母抽出物の形態で、増殖培地1 lあたり約2~約15 gの抽出物の濃度で与えられる。好ましくは、1 lあたり約4 gが与えられる。ペプトン、トリプトン、コーン浸漬溶液などの他の窒素源を使用することができる。これらの源の添加量は当業者により容易に決定される。窒素はバッチ式で、すなわち培養前に一度ですべてを加えることができる。

【0021】典型的には約25~30℃の適当な温度での3~4日間の培養後、接種物として使用するのに十分な量の菌が従来の攪拌タンク発酵器 (STF) の中で増殖された。このような発酵器は当業者に知られており、商業的に入手しうる。発酵はバッチ式、供給バッチ式または連続発酵式で行うことができる。好ましくは、STFはRush ton型タービン羽根車を備えている。

【0022】発酵系は、所望の炭素および窒素源を加えることにより調製される。例えば、1.5 l 発酵系は水道水 1 l あたり約 50 g のグルコースおよび約 15 g の酵母抽出物を混合することにより調製することができる。前記したように、他の炭素源、窒素源またはこれらの混合物を使用することができる。

【0023】養分溶液を含有する反応器は例えば接種する前に加熱することにより滅菌する必要がある。約 30℃ に冷却した後、接種物を加え、培養を開始することができる。ガス交換は空気の散布により行われる。空気の散布速度は変えることができるが、好ましくは約 0.5 ～ 約 4.0 VVM (1 分あたりの、発酵系容量あたりの空気容量)。好ましくは、溶解した酸素レベルは溶液の空気飽和値の約 10% ～ 約 50% に維持される。したがって、培養の間に散布速度の調整が必要である。攪拌することが望ましい。攪拌は羽根車により行われる。羽根先の攪拌スピードは好ましくは約 50 cm/秒 ～ 約 500 cm/秒 の範囲内に設定され、より好ましくは約 100 ～ 200 cm/秒 である。

【0024】一般に、接種量は変えることができる。典型的には、約 2 ～ 約 10 容量% の接種物を使用できる。好ましくは、発酵系種装置の中で約 5 容量% の接種物を使用できる。

【0025】養分レベルは監視する必要がある。グルコースレベルが 5 g/l 以下に低下した場合、追加のグルコースを加える必要がある。典型的な培養サイクルは 1 l あたり約 100 g のグルコースおよび約 15 g の酵母抽出物を使用する。菌による油の生成を促進するため、培養過程中に窒素を減らすことが望ましい。このことはモルティエラアルピナを生成有機体として使用する場合、特にそうである。

【0026】時折り、培養物は過剰量の泡を生成する。場合によっては、当業者に知られているような消泡剤、例えば Mazu 310 (登録商標) を加えて泡を防止することができる。

【0027】培養温度は変えることができる。しかしながら、ARA および EPA の両方を生成する菌はより高温で培養されると、EPA を少なく、また ARA を多く生成する傾向がある。例えば、モルティエラアルピナは 18℃ 以下で培養されると、EPA を生成し始める。したがって、ARA の優先的な生成をひき起こすようなレベルに温度を維持することが好ましい。好適な温度は典型的に約 25℃ ～ 約 30℃ である。

【0028】好ましくは、所望のバイオマス密度が達成されるまで培養は継続される。望ましいバイオマスは約 25 g/l の有機体である。このようなバイオマスは典型的に接種後 48 ～ 72 時間内に達成される。この時点で、有機体は典型的に約 5 ～ 40% の複合脂質、すなわちその約 10 ～ 40% が ARA であり、採取することのできる油を含有する。

【0029】採取は例えばろ過、遠心分離またはスプレ

ー乾燥のような適当な方法により行うことができる。より低コストであるために、ろ過が好ましい。

【0030】採取後、菌糸体ケーキ (mycelial cake) を抽出することができる。菌糸体ケーキは採取後に得られるバイオマスの収集に関連する。ケーキはゆるめたり、圧縮したりすることができ、またはぼろぼろにくずしたり、堅めることができる。場合によっては、抽出前に真空乾燥または凍結乾燥を行うことによって、ケーキの残留水を除去することができる。これを行う場合、ARA 含有油を抽出するのに非極性溶媒を使用することが好ましい。何れの非極性溶媒も好適であるが、ヘキサンが好ましい。

【0031】別法として、湿ったケーキ (典型的には約 30 ～ 50% の固形分を含有する) はぼろぼろにくずし、エタノールまたはイソプロピルアルコールのような極性溶媒を使用して直接、または CO₂ または NO のような溶媒を用いた超臨界流動抽出により抽出することができる。好ましくは、ケーキは抽出前にぼろぼろにくずされる。有利には、本発明は超臨界流動抽出技術の経済的な使用を可能にする [McHugh ら, Supercritical Fluid Extraction, Butterworth (1986 年)]。このような技術は当業者に知られており、例えばコーヒー豆からカフェインを取り除くのに応用されている。湿潤および乾燥抽出からの収量は同程度であるが、湿潤抽出は一般により経済的な方法である。

【0032】水性抽出の好ましい方法は菌糸体バイオマスに極性溶媒のイソプロピルアルコールと適当な反応容器中で混合することを含む。このような反応容器は知られている。バイオマス 1 部あたり 3 ～ 6 部の溶媒を使用することが望ましい。最も好ましくは、脂質抽出物中の ARA の酸化を防止するため、混合は窒素下で、または抗酸化剤の存在下で行われる。本明細書で使用される「脂質抽出物」、「油」、「脂質合成物」および「真菌油 (fungal oil)」なる用語は交換可能に使用される。

【0033】抽出後、混合物をろ過して脂質抽出物を含有する溶媒からバイオマスを取り除くことができる。この時点で、バイオマスを回収し、補助食として使用することができる。本明細書で使用される「補助食」なる用語は動物に与えることのできる穀類などのような典型的な食料と混合される食料または添加剤を意味する。

【0034】溶媒は脂質抽出物から分離され、また適当な収集器中に蒸発させることにより再使用のために回収することができ、そして「粗製油」と呼ばれるものが残留する。イソプロピルアルコールの溶媒としての使用は、蒸発により自然に生成した水/イソプロピルアルコール共沸混合物が除去されるため、粗製油から残留水を取り除く。

【0035】粗製油はさらに処理することなく使用できるが、またさらに精製することができる。植物性生成物からのレシチンの製造において使用される方法のよう

な、当業者に知られている方法をこの追加の精製工程で
使用することができる。このような方法はARA含有脂
質またはARAそれ自体を化学的にまたは共有結合的に
変性しない。収量は変わるが、典型的には乾燥菌糸体10
0gあたり約5gのARA含有リン脂質である。モルテ
ィエラアルピナの場合、乾燥菌糸体100gあたり追加
の10~30gのトリグリセリドを得ることができる。精製
油または精製生成物をヒトに投与するため使用すること
ができる。これらは何れも本明細書で使用するARA

SCOの定義に包含される。

【0036】最も好ましい本発明の目的は、調合乳中の
ARAの濃度がヒトの母乳中のARAの濃度とほぼ等し
くなるように調合乳に使用される添加剤を提供すること
である。表2に、ARASCOと母乳、ARASCOの
欠乏したおよびそれを含有する調合乳との脂肪酸組成の
比較を示す。

【0037】

【表2】

表2. 菌油生成物および母乳の脂肪酸組成

| 脂肪酸 | ARASCO | 調合乳 | 調合乳+油 | 母 乳 ¹ |
|--------|--------|------|-------|------------------|
| 8:0 | -- | 24.1 | 23.6 | 0.35 |
| 10:0 | -- | 17.7 | 17.3 | 1.39 |
| 12:0 | -- | 14.9 | 14.6 | 6.99 |
| 14:0 | 4.6 | 5.8 | 5.8 | 7.96 |
| 16:0 | 16.6 | 6.8 | 7.0 | 19.80 |
| 16:1 | 3.2 | 0.2 | 0.3 | 3.20 |
| 18:0 | -- | 2.3 | 2.3 | 5.91 |
| 18:1 | 26.4 | 10.0 | 10.3 | 34.82 |
| 18:2n6 | 9.9 | 17.4 | 17.3 | 16.00 |
| 18:3n3 | 4.1 | 0.9 | 1.0 | 0.62 |
| 20:1 | 2.2 | 0.1 | 0.14 | 1.10 |
| 20:2n6 | -- | -- | -- | 0.61 |
| 20:3n6 | 1.4 | -- | 0.03 | 0.42 |
| 20:4n6 | 32.0 | -- | 0.64 | 0.59 |
| 20:5n3 | -- | -- | -- | 0.03 |
| 22:1 | -- | -- | -- | 0.10 |
| 22:4n6 | -- | -- | -- | 0.21 |
| 22:5n6 | -- | -- | -- | 0.22 |
| 22:6n3 | -- | -- | -- | 0.19 |

¹ Simopoulos, A. の Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease, 第115-156 頁 (1990年)

【0038】ARASCOにより補足される調合乳中に
存在するARAの量はヒトの母乳中のARA量にほぼ等
しい。さらに、調合乳の総脂肪酸組成はARASCOの
添加によって有意に変化されなかった。典型的には、調
合乳1lあたり約50~約1000mgのARASCOを使用す
ることができる。必要なARASCOの特定量はARA
含有量に依存する。これは油中の脂肪酸の約10~約50%
と変えることができる。しかしながら、典型的にはAR
A含有量は約30%である。ARA含有量が約30%である
場合、特に好ましい補足量は調合乳1l当たり約600~7
00mgのARASCOである。このような量は50部の調合
乳の油に対してほんの一部のARASCOでSimil
iac (登録商標; Ross Laboratories社製) のような調
合乳の前から存在する脂肪成分を希釈する。好ましく
は、ARASCOは実質的にEPAを含まない。

【0039】ビチウムインシディオサムが上記の方法に
おいて使用される場合、抽出されるARA含有油は主と
してリン脂質である。モルティエラアルピナが本法に
おいて使用される場合、ARA含有油は主としてトリグ
リセリドである。何れの形態のARASCOも調合乳へ

の添加剤として有用である。前者は調合乳にARAだけ
でなく乳化剤、すなわち一般に市販の調合乳に加えられ
るホスファチジルコリンもまた与える。モルティエラ
アルピナからの油はより経済的に生成すると考えられ
る。

【0040】本発明のARA含有油は調合乳用添加剤と
しての使用の他に多くの用途を有する。当業者に知られ
ているように、ARA欠乏を伴う多くの病状、例えば消
耗症 [Vajreswariら, Metabolism 39, 779~782 (1990
年)] またはアトピー性疾患 [Melnik, B. Monatssch
r. Kinderheilkunde, 138, 162~166 (1990年)] がある。
本発明の一態様において、これらの症状は薬学的に有効
量の本発明の油を投与することにより治療される。油は
健康を管理する人の選択に応じて経腸的に、局所的にま
たは非経口的に投与することができる。

【0041】当業者に知られているようなカプセル封入
は経腸的投与の有効な方法である。真菌油を含有するカ
プセルはARAの食事での補給を必要とするか、または
望んでいる人達に投与することができる。このような方
法は妊娠している女性、または乳飲み子の母親にARA

を投与するのに特に有効である。

【0042】病状に伴うARA欠乏を克服するためにARASCOが投与される場合、薬学的に有効量を投与する必要がある。この量は当業者によりさらに実験することなく決定されうる。

【0043】本発明の別の態様はARASCOを含有する化粧品用組成物を包含する。化粧品用組成物とは化粧品として適用される化合物を意味する。このような組成物の好ましい例はしわ用クリーム (wrinkle cream) である。このような化粧品用組成物は皮膚の状態を維持するのを助けるための、ARAを皮膚に局所的に塗布する有効な手段を提供する。

【0044】本発明を一般的に記載したが、次の非限定的な実施例を用いて本発明をさらに詳しく説明する。

【0045】

【実施例】〔実施例1〕ピチウムインシディオサム脂質の製造および調合乳への添加

80 l (総容積) の発酵器の中で、51 l の水道水、1.2 kg のグルコース、240 g の酵母抽出物および15 ml の Mazu 210 S (登録商標) 消泡剤を混合した。発酵器を12°Cで45分間滅菌した。滅菌工程中に、さらに5 l の凝縮水を加えた。pHを6.2に調整し、次いで約1 l のピチウムインシディオサム (ATCC #28251) の接種物 (細胞密度5~10 g/l) を加えた。攪拌速度を125 RPM (羽根先のスピード250 cm/秒) に調整し、そして通風速度を1 SCFM (標準立方フィート/分) に設定した。操作開始後24時間に、通風速度を3 SCFMまで増加させた。28時間に、さらに2 l の50%グルコースシロップ (1 kgグルコース) を加えた。50時間に発酵器から採取し、湿潤重量で1 l あたり約2.2 kg (乾燥重量で約15 g) を収量し

た。採取したバイオマスを凍結乾燥する前に吸引ろ過により絞り出して高い固形分のケーキ (50%固形分) とした。乾燥したバイオマスを乳鉢および乳棒を用いて粉碎し、そして2時間連続攪拌しながら室温で乾燥バイオマス200 g あたり1 l のヘキサンを用いて抽出した。次に、混合物をろ過し、ろ液を蒸発させて乾燥バイオマス100 g をたり約5~6 g の粗製油を得た。バイオマスを1時間室温で乾燥バイオマス20 g あたり1 l のエタノールを用いて再び抽出し、ろ過し、そして溶媒を蒸発させて乾燥バイオマス100 g あたり追加の22 g の粗製油を得た。第2のフラクションは主としてリン脂質であるが、第1のフラクションはリン脂質およびトリグリセリドの混合物を含んでいた。

【0046】合一したフラクションは約30~35%のアラキドン酸を含有し、EPAが検出されない油を生成した。この油を市販の調合乳製品 Similac (登録商標; Ross Laboratories社製) に調製溶媒1 l あたり600 mg の補足量で滴加した。

【0047】〔実施例2〕モルティエラアルピナ脂質の製造および調合乳への添加
モルティエラアルピナ (ATCC #42430) を1 l の水道水および20 g のポテトデキストロース培地を含有する2 l の振とうフラスコ中で増殖した。フラスコを一定のオービタル攪拌下に置き、7日間25°Cに保持した。遠心分離による採取後、バイオマスを凍結乾燥して約8 g の脂質に富んだ菌糸体を得た。実施例1のようにしてヘキサンを用いて菌糸体を抽出して約2.4 g の粗製油を得た。この油は約23%のアラキドン酸を含有し、市販の調合乳 Similac (登録商標) に1000 mg/l の濃度で滴加した。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

F I

(C 1 2 P 7/64

C 1 2 R 1:645)

(71) 出願人 598083706

6480 Dobbin Road, Columbia, Maryland 21045, United States of America